



НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
НЕТУБЕРКУЛОЗНИТЕ МИКОБАКТЕРИИ В БЪЛГАРИЯ

Юлияна Асенова Атанасова

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Микробиология

Научни ръководители:

Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, дм

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

София, 2022 г.

Дисертационният труд е разработен в отдел Микробиология, НЦЗПБ, гр. София.
Представен е за обсъждане на разширен колегиум на отдел Микробиология, НЦЗПБ, на 07.12.2021г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 164 страници, 19 таблици и 44 фигури.
Библиографската справка включва 307 литературни източника, от които 8 на български език и 299 на английски език.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ.

Публичната защита ще се състои на 2022 г. от ч. в аулата на НЦЗПБ, бул. „Янко Сакъзов“ № 26, гр. София, на открито заседание на научно жури, назначено със заповед № 304/20.12.2021г. на директора на НЦЗПБ, съгласно ЗРАСРБ и ППЗРАСРБ в състав:

Председател: Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, дм - НЦЗПБ, гр. София

Членове:

1. Проф. д-р Стефана Донева Събчева, дм, УСБАЛО, гр. София – рецензия
2. Проф. Стефан Въчев Панайотов, дн, НЦЗПБ, гр. София – рецензия
3. Проф. д-р Магдалена Иванова Лесева, дм, УМБАЛСМ „Пирогов“ – становище
4. Доц. д-р Росица Вачева-Добревска, дм, УМБАЛ „Царица Йоанна“ – становище
5. Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, дм, НЦЗПБ, гр. София – становище



НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ НЕТУБЕРКУЛОЗНИТЕ
МИКОБАКТЕРИИ В БЪЛГАРИЯ**

Юлияна Асенова Атанасова

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Микробиология

Научни ръководители:

Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, дм

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

София, 2022 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък съкращения.....	5
Въведение.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
1. Период и материали на проучването	9
2. План на проучването	9
3. Алгоритъм за провеждане на идентификация на НТМ	10
4. Методи	13
5. Условия за съхранение	18
6. Използвани статистически методи за анализ	18
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	19
1. Демографска структура и рискови фактори	20
2. Географско разпределение	22
3. Анализ на изследвания клиничен материал.....	23
4. Видова структура на изолираните НТМ	24
V. ИЗВОДИ	33
VI. ПРИНОСИ	34
1. Приноси от научен характер	34
2. Приноси от научно-приложен характер.....	34
VII. ЛИТЕРАТУРА	35
VIII. ПРИЛОЖЕНИЕ	39
1. Списък публикации, свързани с дисертацията	39
2. Участия в конгреси и научни форуми, свързани с дисертацията	39
IX. ABSTRACT	43

СПИСЪК СЪКРАЩЕНИЯ

КУБ	Киселинно устойчиви бактерии
КС	Клетъчната стена
МИ	Микроскопско изследване за КУБ
НРЛ ТБ	Национална референтна лаборатория по туберкулоза
НТМ	Нетуберкулозни микобактерии
НЦЗПБ	Национален център по заразни и паразитни болести
НТМ ББ	Белодробна болест причинена от нетуберкулозни микобактерии
ТБ	Туберкулоза
ТЛЧ	Тест за лекарствена чувствителност
ХОББ	Хронична обструктивна белодробна болест
ATS	(American Thoracic Society) Американското торакално дружество
СН	Кистозна фиброза
LJ	хранителна среда Löwenstein–Jensen
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MTBC	Mycobacterium tuberculosis complex
RGM	(Rapidly Growing Mycobacteria) Бързорастящи микобактерии
SGM	(Slowly Growing Mycobacteria) Бавнорастящи микобактерии

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Нетуберкулозните микобактерии (НТМ) придобиха актуалност като причинители на инфекциозни заболявания в края на XX век, като отговорна за това беше ХИВ инфекцията. През последвалите години, се отчита рязко увеличаване честотата на заболяванията причинени от тези микроорганизми, в световен мащаб, главно сред ХИВ-негативни пациенти, с акцент върху пациенти с хроничните белодробни инфекции, които представляват до 90% от случаите.

Традиционно са означавани с термина въведен от Pinner през 1935 г. - „атипични микобактерии“ (Pinner M. 1935). Във времето са използвани различни синоними, като: „атипични“, „анонимни“, „опортюнистични микобактерии“, „микобактерии на околната среда“, „микобактерии, различни от туберкулозата“ и др. Терминът – НТМ е въведен и възприет от Американското торакално дружество (ATS) през 1990 г. Понастоящем той е най-широко прилаган в международната научна литература, като ударението пада на ясното им разграничаване от причинителя на туберкулозата. Заболяванията причинени от НТМ, са наречени „микобактериоза“ или „опортюнистични микобактериални заболявания“ (Daley C L *et al.* 2020).

Поради липсата на информация за предаване на НТМ заболяванията от човек на човек в повечето държави по света, както и в тези от ЕС/ЕИП, в частност и в България, те не се водят на отчет и епидемичната ситуация до голяма степен е неизвестна.

Като причини за увеличаването на микобактериозите в световен мащаб се посочват редица фактори сред които: увеличаване на броя на имunosупресирани пациенти, застаряване на населението, ХИВ/СПИН, достъпността на естетичната хурургия, масовото татуиране и др. Пациенти страдащи от кистозна фиброза, ХОББ, преболедували туберкулоза, злокачествено белодробно или хематологично заболяване, както и деца с цервикален лимфаденит са суспектни за развитие на микобактериоза. Употребата на инхалаторни кортикостероиди и лечението с инхибитор на тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α) също са свързани с развитие на микобактериоза. Като предразполагащи са описани и генетични фактори като дефицит на интерлевкини 12 (IL-12) (Szturmowicz M. *et al.*, 2018).

Доказва се, че между географските райони съществуват различия в честотата на изолация на НТМ и на микобактериозите. Симптомите често са неспецифични и са свързани с вече съществуващи белодробни състояния. Лечението е комплексно, с

несигурна ефикасност, а продължителността обикновено е 18-24 месеца. Поради възможността за рецидив, целта е стабилизиране на симптомите и предотвратяване на прогресиране на болестта.

В резултат на това, се създават специфични предизвикателства за диагностиката, а точната лабораторна микробиологична диагностика на клинично значимите микобактериални видове е важен елемент за ефективно лечение и контрола на болести предизвикани от НТМ.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е да се направи микробиологично проучване, за да се оцени степента на изолация на НТМ видове от клинични проби, да се регистрират географските различия и да се определи клиничната им роля в България.

Във връзка с поставената цел, бяха разработени следните задачи:

1. Да бъдат отдиференцирани фенотипно НТМ от *M. tuberculosis* complex.
2. Да бъде разработен алгоритъм за микробиологична диагностика на НТМ в България.
3. Да се направи видова идентификация на клиничните изолати НТМ чрез генетични методи.
4. Да се анализира разпространението на клинично значимите НТМ на територията на страната.
5. Да се охарактеризират засегнатите групи пациенти по пол, възраст и локализация на инфекцията.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Период и материали на проучването

Проучването е ретроспективно и включва период от осем години: от януари 2010 година до декември 2017 година включително. В посочения период с изолиран щам НТМ са потвърдени 586 пациенти.

2. План на проучването

- Определяне на таргетната група пациенти.
- Видова идентификация на НТМ изолирани от клиничен материал.
- Определяне на преобладаващите видове НТМ на територията на страната и характеристика на засегнатите групи.
- Определяне на честота на НТМ изолацията и заболяемостта за страната.

Обхванати са само пациенти suspectни за туберкулоза (или в диференциално диагностичен план за изключване на диагнозата туберкулоза), от цяла страна, изследвани в ТБ лабораторната мрежа в страната (30 лаборатории осъществяващи културелна диагностика), като в групата се включват областните лаборатории за микробиологична диагностика на туберкулозата и НРЛ ТБ, НЦЗПБ.

Първичното диференциране на щамата като НТМ/ТБ се извършва в съответната лаборатория, която го е изолирала, на базата на фенотипната характеристика на колониите, микроскопски препарат за КУБ, някои биохимични отнасяния и имунохроматографски тест. За конкретна видова идентификация, щамовете, със съмнение за НТМ се изпращат в НРЛ по ТБ, НЦЗПБ, която осъществява видовата идентификация на НТМ за цялата страна, където освен посочените по-горе методи се използва и молекулярен метод за анализ.

Предвид това, че се касае за пациенти suspectни за туберкулоза, всички процедури по деконтаминация, инокулиране и идентификация са проведени в ламинарен бокс, клас 2 при използване на необходимите за целта лични предпазни средства.

3. Алгоритъм за провеждане на идентификация на НТМ

На **Фигура 1** е показан диагностичният алгоритъм разработен и използван от нас. Взехме предвид такива разработени от водещи микобактериолози, както и се съобразихме с ATS, BTS и че всички използвани алгоритми и методи за изследване на проби за НТМ в микобактериологичните лаборатории трябва да гарантират бързото и точно откриване и идентифициране на *M. tuberculosis complex*. Друг важен момент е задължителното провеждане на микроскопия по Ziehl-Neelsen от положителните култури. Тестовите за видова идентификация на НТМ се изпълняват за всички положителни за КУБ култури с орицателен резултат от тест за МТВС.

Суспектните за микобактериоза пациенти се насочват от лекуващ лекар за микробиологично изследване за микобактерии. От място, представително за тяхната инфекция се взема подходящо количество клиничен материал.

В микробиологичната лаборатория той се приема и регистрира след визуална оценка на неговото качеството.

Процедурата по обработка стартира с деконтаминация и последвала инокулация върху подходяща хранителна среда (2 броя твърда - Löwenstein-Jensen и/или 1 брой течна MGIT, инкубирана на автоматизирана система BD BACTEC™ MGIT™ 960 System с производител Becton Dicsenon, USA), последвани от препарат оцветен по Ziehl-Neelsen за микроскопска оценка за КУБ на деконтаминирания клиничен материал.

При положителен резултат от микроскопското изследване, поради невъзможността да бъдат отдеференцирани КУБ на НТМ от тези на МТВС, материалът се насочва към молекулярно генетичен тест за бързо доказване на МТВС, директно в клиничен материал. Отрицателният резултат при положителен микроскопски препарат е вероятен показател за наличието на НТМ в клиничния материал.

Всички проби инокулирани на хранителна среда (отрицателните и положителните за КУБ), се инкубират на 37°C за 56 дена на твърда и 42 дена за течна хранителна среда. При съмнения за наличие на НТМ, които изискват специални условия на култивиране, допълнителни епруветки се инкубират в подходяща среда (светло, тъмно, различна температура и др.).

При наличие на растеж, с цел изключване на контаминация, от съответната култура се оцветява микроскопски препарат за откриване на КУБ.

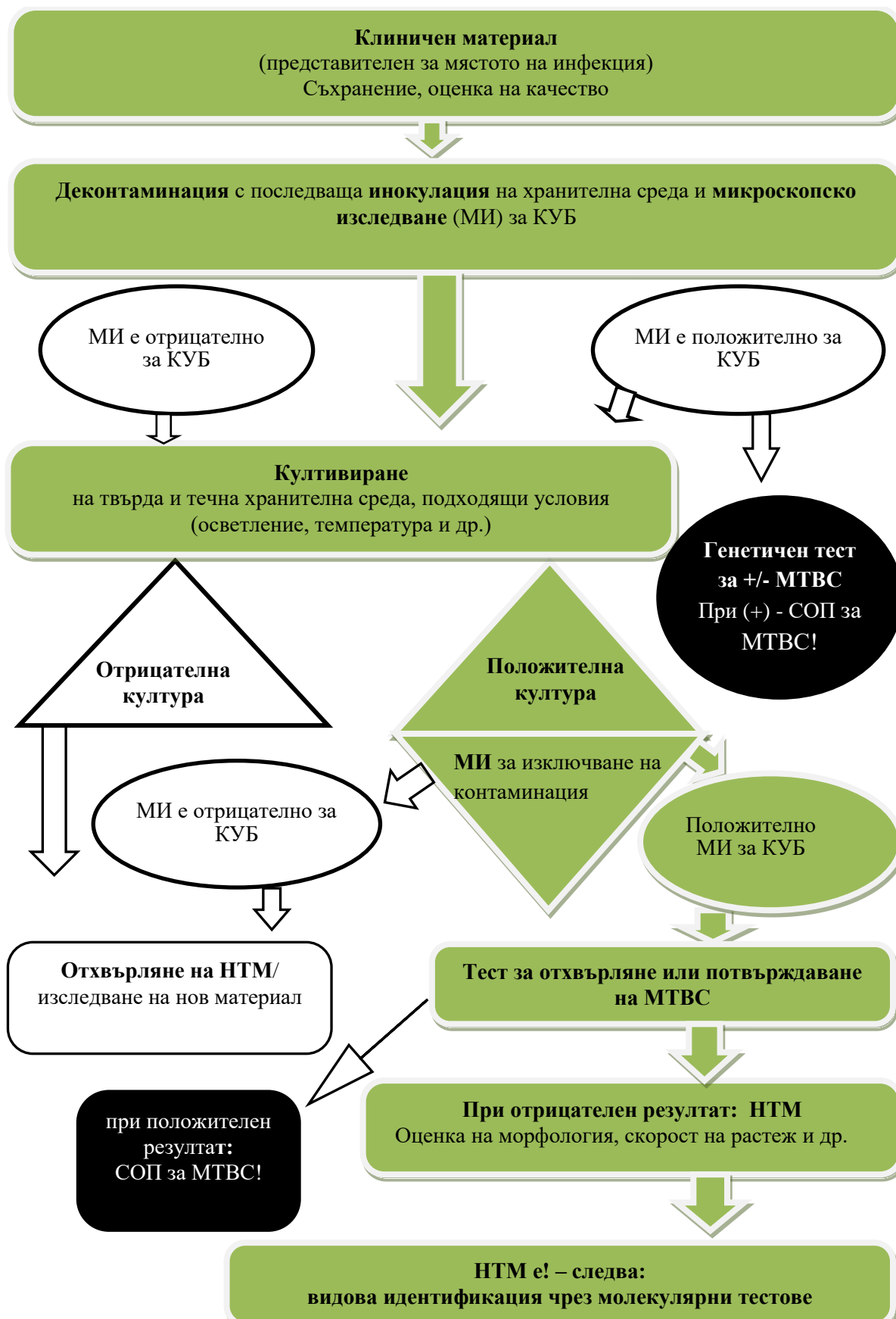
Положителните за КУБ култури се отдеференцират от МТВС чрез имунохроматографски тест за наличие на МРТ64Ag, като при положителен резултат се

изпълнява протокола за *M. tuberculosis* complex. От чиста култура се изпълняват и биохимични тестове за определяне на чувствителност към рNBA, нитратредуктазен и ниацинов тест, които също служат за отdeferенциране на НТМ от МТВС.

НТМ са изолатите, които са положителни за КУБ, но отрицателни за МРТ64Ag, резистентни към рNBA и повечето от тях отрицателни на ниацинов и нитратредуктазен тест. За тези щамове се изпълнява процедура по видова идентификация на НТМ.

Тя стартира с оценка на темпа на растеж с цел да се определи дали изолатите са бавно или бързорастящи НТМ (по-малко или повече от 7 дена на твърда стеда) и визуална оценка на оцветяването и типа на растеж (груби/гладки колонии).

Изолира се ДНК, която се използва за провеждане на молекулярни тестове за точна видова идентификация на НТМ.



Фигура 1 Алгоритъм за изолиране и идентификация на НТМ, адаптиран по (Jakko van Ingen, 2015).

4. Методи

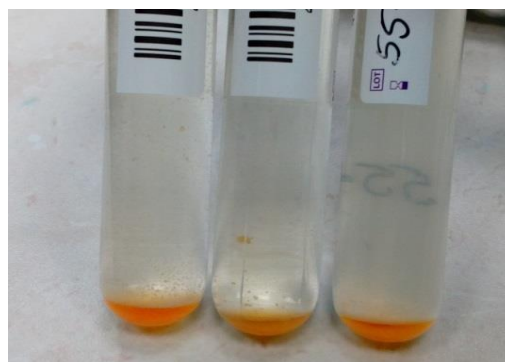
Първичната обработката на клиничните материали, инокулирането на средите и култивирането, са осъществени съгласно Методичното указание за микробиологична диагностика и лечение на туберкулозата (МЗ, 2016).

Важна стъпка за откриване на микобактерии в клиничния материал е микроскопското изследване за КУБ. Препарат се изготвя от деконтаминирания клиничен материал, непосредствено след инокулацията на хранителните среди и от полижителна култура. Той се оцветява по метода на Ziehl-Neelsen, и му се прави полу-количествена оценка. Това е лесно изпълнима, бърза и евтина скринингова техника.

Културелното изследване остава златният стандарт за лабораторно потвърждение на НТМ, като след изолиране на щам се провеждат тестове за генотипна идентификация на вида. При култивиране върху твърди среди може да се наблюдава морфологията на колонията, скоростта на растеж, пигментацията и се дава количествената оценка на растежа. Течните хранителни среди не дават тази информация, но са по-чувствителни и увеличават откриваемостта на НТМ, но също така са склонни към лесна контаминация, бактериален свръхрастеж, влияят върху коректното отчитане на скоростта на растеж (Griffith DE. *et al.*, 2007). На **Фигури 2 и 3** са показани различните фенотипни характеристики на колонииите НТМ, които наблюдавахме при изоляцията им върху твърда хранителна среда Löwenstein–Jensen или течна – MGIT. Това са: наличие на пигментация, конфлуентност на растежа, тип на колонии- сухи/мазни. Бистрата течна среда с кристалчета е признак за липса на контаминация. В някои случаи, наличието на пигментация, както може да се види от **Фигура 3**, е възможно да бъде отчетено и при растеж в течна хранителна среда.



Фигура 2. НТМ изолирани върху твърда хранителна среда Löwenstein–Jensen (*M. kansasii*, *M. chelonae*, МТВС, *M. goodii*)



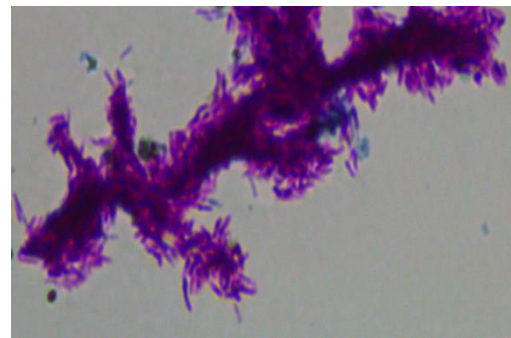
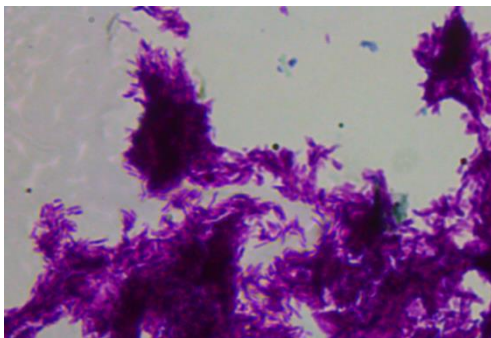
Фигура 3. НТМ изолирани върху течна хранителна среда MGIT

Снимки НРЛ по ТБ

След успешната изолация, се осъществи идентификацията на НТМ чрез прилагане на големи групи микробиологични методи: фенотипни, биохимични, имунохроматографски и молекулярно-генетични.

- Приложихме следните **фенотипни методи**: отчитане на бързина на растеж, отчитане на оптимална температура на растеж, определяне на морфологията на колонииите, определяне на пигментацията, наличие на корд фактор.

На **Фигура 4 и 5** е показан наблюдаван от нас корд-фактор. Той се открива при на микроскопски препарати оцветени за КУБ от положителни култури. Представлява липиден компонент (трехалоза 6,6'-димиколат) на клетъчната стена. Характерен е за *M. tuberculosis* и участва в патогенезата на инфекцията. Откриването му често е повод за бърза идентификация на МТВС, защото по-голямата част от видовете НТМ нямат тази характеристика. Съществуват и изключения, както и видове НТМ които го образуват. Такива са – *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. terrae* и *M. phlei*. МАС не го образуват (Sánchez-Chardi, et al., 2011). Представените по-долу авторски снимки на **Фигура 4 и 5** представят наблюдаван от нас корд-фактор образуван от чистата култура на *M. marinum*, изолирана на течна хранителна среда МGIT. Наблюдават се конгломерати от огромен брой преплетени бактериални клетки, които изграждат корд фактора.



Фигура 4 и 5: Корд фактор образуван от *M. marinum* в чиста култура от течна хранителна среда.

Снимки НРЛ по ТБ; Микроскоп Leica DFC 425C/ имерсия, увеличение 100x/

- **Биохимични тестове:** отчитане на продукция на ниацин, тест за отчитане на наличие на нитрат редуктаза; определяне на чувствителност към р-нитробензоена киселина (р-NBA).

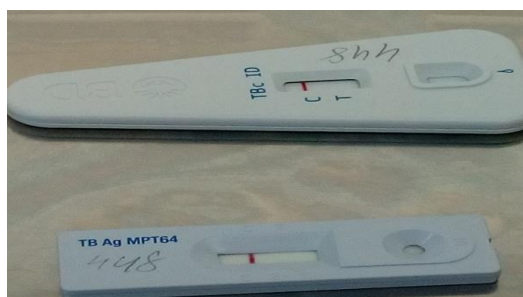
В Таблица 1 е са обобщени очакваните основни фенотипни отнасяния и резултати от биохимични тестове за щамове НТМ и МТВС .

Таблица 1 – Очаквани резултати от използвани фенотипни и биохимични тестове за диференциация между НТМ и МТВС.

Идентификация	Отчитане на Пигментация	Образуване на корд фактор	Резултат от ниацинов тест	Резултат от тест за нитрат редуктаза	Резултат от Тест за РНВ
НТМ	да/не	-/+	-/+	-/+	+/-
МТВС	не	+	+	+	-

- **Имунохроматографски тест** за отчитане на МРТ 64 Ag

В дисертационния труд са използвани следните два имунохроматографски теста показани на **Фигура 6**: BD MGIT MTC Identification Test, BD (Becton, Dickinson and Company) Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA пригоден за използване само за изолати от течна хранителна среда и SD Bioline TB Ag MPT64RAPID®, който се изпълнява за щамове изолирани на течна и твърда среда. Те са предназначени за бързо и качествено определяне на антиген от щам МТВС изолиран в чиста култура. Откриват МРТ64, микобактериална белтъчна фракция, която се секретира от МТВС клетките. Антигенът от пробата се свързва с антителата, които са конюгирани с визуализиращите частици върху тестовата лента. Наличието на положителни епруветки за КУБ, но отрицателни на теста ги определя като НТМ. Тези щамове подлежат на допълнителна видова идентификация, за изясняване на вида микобактерии.



- Резултат от имунохроматографски тест- BD MGIT TBc Identification Test, BD, USA, отрицателен за МТВС.
- Резултат от имунохроматографски тест SD Bioline, отрицателен за МТВС.

Фигура 6.: Интерпретация на резултата от имунохроматографски тест.

/Снимки НРЛ по ТБ /

- **Генетични методи:** Geno Type® Mycobacterium CM/AS.

Тестът GenoType® Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) се основава на DNA•STRIP® технологията и позволява молекулярно генетично идентифициране на 16 клинично значими вида НТМ едновременно с определянето на МТВС от култури на твърда или течна хранителна среда.

Процедурата е разделена на етапи:

1. Изолация на ДНК от култура от твърда/течна хранителна среда чрез използване на кит за изолация GenoLyse® (Hain Lifescience, Nehren, Германия) или чрез ултразвуково ДНК накъсване.
2. Мултиплексна амплификация с биотинирани праймери на фрагмент с приблизително 230 н.д. от гена 23S рРНК. Профилите за амплификация на двата теста не се различават, те са показани в **Таблица 2**.

Таблица 2: Профил за амплификация на GenoType® Mycobacterium CM/AS

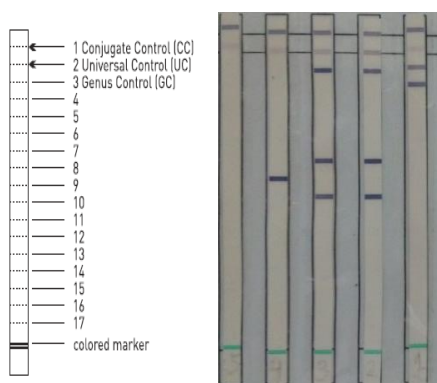
Продължителност	Температура	Брой повторения
15 минути	95°C	1 цикъл
30 секунди	95°C	10 цикъла
2 минути	58°C	
25 секунди	95°C	20 цикъла
40 секунди	53°C	
40 секунди	70°C	
8 минути	70°C	1 цикъл

3. Обратна хибридизация на амплифицирания продукт към специфични олигонуклеотиди, имобилизирани на мембранен стрип, като по този начин, чрез ензим медирана реакция се визуализира крайния продукт. Извършва се с помощта на автоматизирано устройство (TwinCubator; Hain).

4. Оценка и интерпретация на резултатите. Всеки стрип има 17 зони на реакция, включително контроли за проверка на процедурите за амплификация и хибридизация (**Фигура 7**). Използва се шаблон, като преди да се пристъпи към

определяне на комбинациите от бандове, отговарящи за определен вид се проследява както наличието, така и качеството на контролните бандовете за процесите на амплификация и хибридизация. Изпълнението на теста позволява идентификация на следните видове: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus complex*, *M. fortuitum group*, *M. gordonae*, *M. intracelulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. peregrinum* както и на *M. tuberculosis complex*.

При резултат *Mycobacterium* spp. или *Mycobacterium marinum*/*M. ulcerans*, *M. malmoense* процесът на идентификация може да продължи с изпълнението на тест GenoType® *Mycobacterium* AS (Additional Species). Той позволява идентификация на допълнителни 17 клинично значими вида НТМ. Тестът може да се изпълни самостоятелно или за доуточнение на вида след GenoType® *Mycobacterium* CM. Процедурата е същата, като при изпълнението на предходния тест. Щамовете може да са изолирани на твърда или течна хранителна среда, като веднъж изолираната ДНК, може да се амплифицира с праймерите на предпочитания тест. Позволява идентифициране на: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastrii*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*.



Фигура 7.: Интерпретация на получените резултати след изпълнение на GenoType® *Mycobacterium* CM и определяне видовете НТМ. Преставени последователно в посока от ляво на дясно: отрицателна контрола, *M. intracelulare*, *M. gordonae*, *M. gordonae*, *M. avium*. /Снимка НРЛ по ТБ/.

В настоящата дисертация за по-точно видовово определяне на всеки изолат от НТМ, сме използвали молекулярно генетичния метод в съчетание с конвенционални фенотипни, биохимични и имунохроматографски методи.

5. Условия за съхранение

на щам НТМ

Изолираните щамове се съхраняваха в лабораторията в хладилник, при температура от 2 до 8° С, на твърда яйчна среда за 1 година или във фризер при температура: -70°С в криоепруветка, съдържаща 1,5 мл 10% skim milk, или 1,5 мл 5% глицерол.

на ДНК

Изолираната ДНК се съхраняваше при -20°С. Не се допуска многократното й замръзване и размръзване.

на ампликони

Крайните продукти от амплификацията се съхраняваха на минус 20°С.

6. Използвани статистически методи за анализ

Използван е Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington) за изчисляване на честотите, процентите, средната възраст и графичния анализ на данните

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

През периода 2010-2017г. в НРЛ ТБ, НЦЗПБ, ние идентифицирахме 586 изолата НТМ. Систематизирането им по години показва ясна насоченост към увеличаване на изолираните щамове в рамките посочения период. Има изявен пик през 2015г. (n=118, 20%). Това може да се обясни с акумулирането на няколко фактора повлияли за подобряване на диагностиката на НТМ в страната. Доказаните като НТМ щамове, включени в дисертационния труд принадлежат на същия брой пациенти. Тяхното разпределение по години е показано на **Таблица 3**. Направено е и изчисление на честота на изолация на НТМ за съответните години, това е т. нар. лабораторно базиран подход, при които се приема съответствието между пациент с изолат и заболяване (van der Werf M. J. et al., 2014; Cassidy P M et al.,2009). Използвана е формулата: брой новодиагностицирани разделен на средногодишно население, на територията на страната умножен по 100 000, като са използвани данните на НСИ за населението на страната за съответната година (Dicker R. et al. 2012). Така за периода от 8 години определяме средното ниво на изолация на микобактерии - 1/100 000 души. Този резултат е съпоставивим с резултатите от други страни от ЕС, с брой на населението близък до нашия. Въз основа на данни от Хърватска, Естония, Гърция, Люксембург и Словения - НТМ се изолира в границите между 0,4-2% от пробите (van der Werf. M. J., 2014).

Таблица 3. Разпределение на щамовете НТМ по години на изолация

Година	2010г.	2011г.	2012г.	2013г.	2014г.	2015г.	2016г.	2017г.	Общо за периода
Брой изолирани НТМ	35	51	62	72	80	118	88	80	586
% от общия брой изследвания	5,97%	8,70%	10,58%	12,29%	13,65%	20,14%	15,02%	13,65%	100,00%
Нови случай за 1 год. на 100 000 души *	0,5	0,7	0,8	1	1,1	1,6	1,2	1,1	1

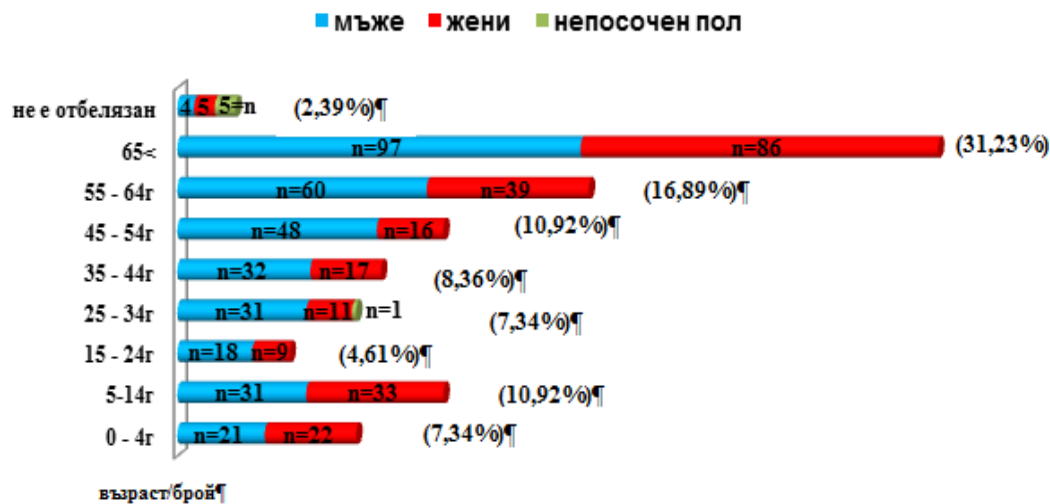
* Използвани са съобщените на страницата на Национален статистически институт демографски данни за периода.

1. Демографска структура и рискови фактори

Съотношението по пол на пациентите в България с изолиран щам НТМ, запазва тенденцията характерна за болните от туберкулоза в страната, т.е. преобладават мъжете – 343 броя (58,53%) и 237 броя (43,58%) жени, като най-голяма е разлика между половете в рамките на възрастовата група 45 – 54г., където мъжете са 75% (n= 48), а жените – 25% (n=16). Единствено в рамките на възрастовата група на лицата от 5 – 14г. жените леко доминират 51,56% (n=33). Тези резултати могат да се обяснят с таргетната група. Ние търсим и изолираме НТМ, главно сред суспектни за туберкулоза пациенти и тези с белодробна патология в диференциално диагностичен план на ТБ. По-всеобхватно национално проучване би могло да промени картината. Проучвания през последните десетилетия в световен мащаб посочват настояща доминация на НТМ сред жените. Така например за периода 2004 - 2006 г. в САЩ, изследване съобразено с микробиологичните критерии на ATS, показва, че разпространението на НТМ е 1,1-1,6 пъти по-високо сред жените спрямо мъжете в САЩ (Prevots DR, et al. 2010). В проучване в ЕС, проведено от NTM-NET, също е показана нарастваща честота на НТМ с изместване на пола във времето от мъже към жени и преобладаване на микобактериозите при пациенти от женски пол (Hoefsloot W, et al. 2013). Различни хипотези, обясняват тези различия свързани с пола при пациенти с НТМ. Изяснява се ролята на половите хормони и медиатори, като лептин и адипонектин, които модулират ключови цитокини като TGF- β (Chan ED, Iseman MD. 2010). Уточнава се връзката с нарушаване на регулацията или свръхпроизводството на матричните металопептидази (ензими, които играят основна роля в клетъчна пролиферация, миграция (адхезия/дисперсия), диференциация, ангиогенеза, апоптоза и защита на гостоприемника). Обсъжда се и възможността предразположението на жените да е свързано с полиморфизми в гени, регулиращи тяхното производство (Hsieh MH, et al.. 2013). На **Фигура 8** е показано разпределението по пол и възраст сред участниците в нашето проучване.

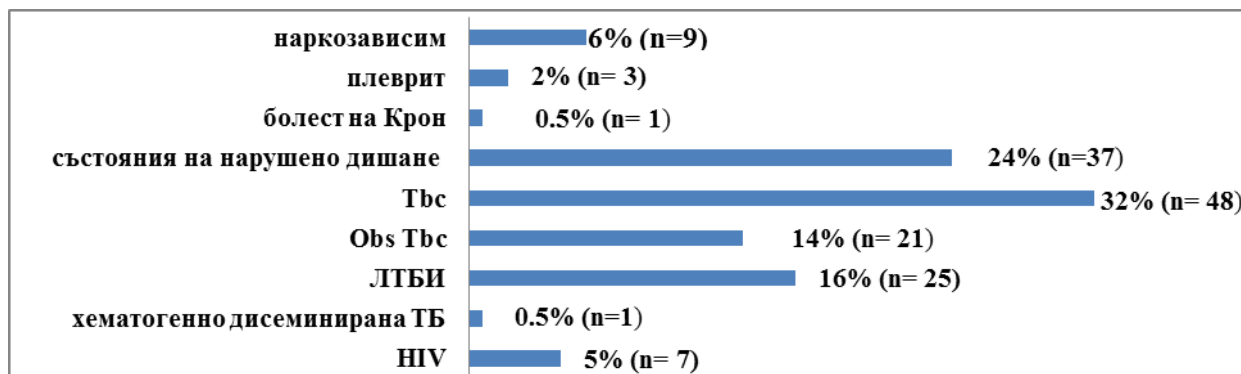
По отношение на възрастовата структура на изследваните пациенти, според нашите резултати в страната са засегнати всички възрасти от 0,1 месец до 93 г., като средната възраст към годината на потвърждаване като НТМ е 47,30 г. Тя е почти изравнена при представителите на двата пола, (съответно 47,14г. за жените и 47,42г. за мъжете). Получените резултати на разпределението по възраст в страната съвпадат с

посочените в литературата, където НТМ инфекциите са по-чести при възрастните хора, отколкото при децата и хора в работоспособна възраст.



Фигура 8.: Разпределение по пол и възрастови групи на пациентите с изолиран щам НТМ, за периода на проучването.

Сред работните диагнози за пациентите в нашето проучване, липсват или са слабо представени най-често докладваните в световен мащаб предразполагащи фактори за развитие на микобактериоза, като кистозна фиброза, силикоза, компрометиран имунитет от химиопрофилактика и кортикостероидно лечение. В проучването пациентите с изяснена причина за микробиологично изследване за НТМ, представляват 26% (n=152) от всички участвали. Сред работните им диагнози най-често преобладават: туберкулоза, Obs. Твс, хематогенно дисеминирана ТБ или ЛТБИ. Те общо са 64% (n=95) пациента, като от тях само 15% (n=15) се лекуват или са били лекувани в миналото от белодробна туберкулоза. За останалите с тази работна диагноза, няма споделена информация дали тя се отнася за прекарана белодробна ТБ или се касае за работна диагноза в резултат на предварителни изследвания на пациента. Най-често срещаните работни диагнози за пациентите в страната са представени на **Фигура 9**. Останалите клинични условия придружаващи оплакванията на пациентите от това проучване са: СПИН – 5% (n=7), наркотична зависимост - 6% (n=9), болест на Крон – 0,6% (n=1) и различни състояния на нарушено дишане в резултат на - ХОББ – 2% (n=3), ХДН – 2% (n=3), бронхиектазна болест 5% (n=8), пневмослероза 1% (n=2), пневмония 12% (n=18) и по 0,6% (n=1) за астма, хроничен бронхит и абсцес на бял дроб.



Фигура 9.: Диагнози, свързани с потенциален повишен риск от нетуберкулозна микобактериална инфекция за пациентите в България.

2. Географско разпределение

Прието е, че честотата на изолацията на определен вид НТМ може да е различна за континентите и отделните географски региони в тях, както и че клиничната значимост не е еднаква в различните части на света. (Griffith DE at al., 2007; Hoefsloot W. et al 2008). Географско разнообразие на НТМ видовете в България досега не е изучавано системно. За изясняване му при пациентите включени в това проучване, те са сравнени по области в страната, на база на адресната регистрация към момента на потвърждаване на НТМ. Макар и с различна честота НТМ се изолират във всички области на страната. Най-много са случаите при пациентите с постоянен адрес от София - град 30%(n=177), следвани от област Пловдив 15%(n=87) и област Варна 12%(n=69), а със значително по-малко изолати за тези живеещи в областите Шумен 0.3%(n=2), В.Търново, Перник, Разград, Търговище – всички с по три изолата за периода, който е обхванат от нас 0.5% (n=3). Диагностцирани са и двама (0.3%) чуждестранни граждани. От представените от нас данни, може да се направи заключение, че гъстотата на популацията оказва влияние върху по-висока честота на изолация на НТМ, както и че представителите на градското население преобладават. Те са близо пет пъти повече от тези живеещи на село.

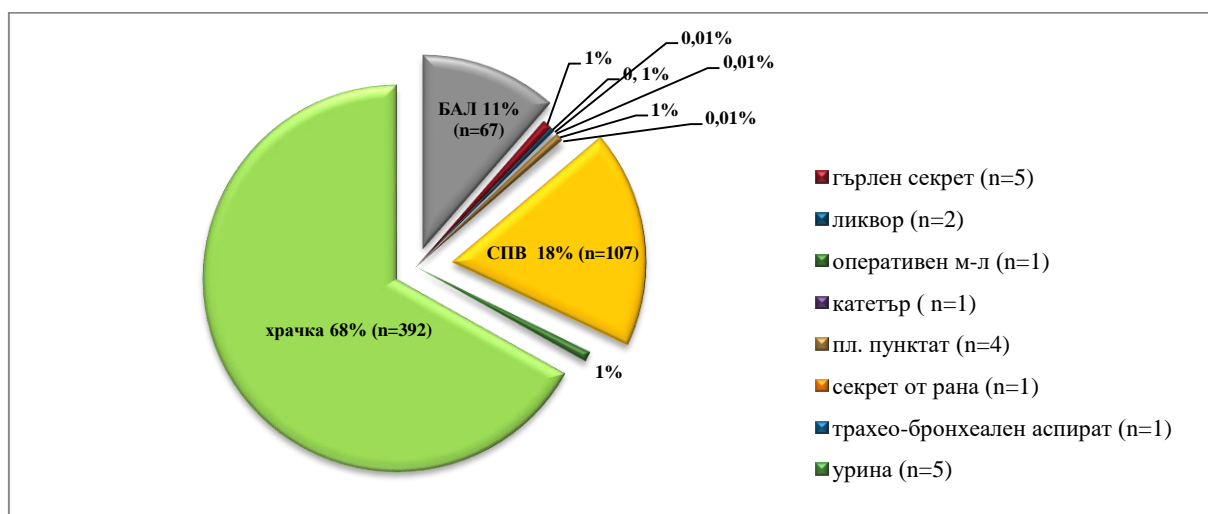
Сред пациентите настанени в социални институции в България са изолирани 4% от щамовете (n=24). От тях 88% (n=21) са на затворници– един от затвора в Пазарджик, 5 щамата от ЦСЗ и 15 щамата от затвора в Пловдив. В Държавната психиатрична болница в с. Карвуна е изолиран 1 щам, а други 2 от социални домове във Варна.

Показахме, че разпространението на видовете НТМ, значително се различава между столицата и останалите региони на страната, както и между Северна и Южна България, като видовото разнообразие на НТМ е по-голямо в Северна България, но в Южна България е по-висока честота на изолацията. Същевременно в няколко области са изолирани само бавнорастящи видове и нито един RGM (Габрово, Смолян, Търговище, Шумен и Ямбол).

3. Анализ на изследвания клиничен материал

Изследван е разнообразен клиничен материал представителен за мястото на инфекцията. Предвид това, че проучването е проведено сред пациенти суспектни за туберкулоза или пациенти с друга белодробна патология щамовете НТМ бяха изолирани предимно от белодробни клинични материали - 97% (n=567), като от тях преобладаваха храчките – 68% (n=392) и 11% БАЛ (n=67), а 3% (n=19) от НТМ щамовете бяха изолирани от извънбелодробни материали, като ликвор, урина, биопсичен материал. На **Фигура 10** е представено процентното съотношение на видовете изследван клиничен материал, от които са изолирани НТМ щамовете.

С положителен резултат от микроскопско изследване по Ziehl-Neelsen са 8% (n=48) от материалите, отрицателните са 92% (n=538). Сред тях отново преобладават храчките – 41 броя (85%), но и един от двата ликвора учатвали в проучването също е положителен за КУБ.



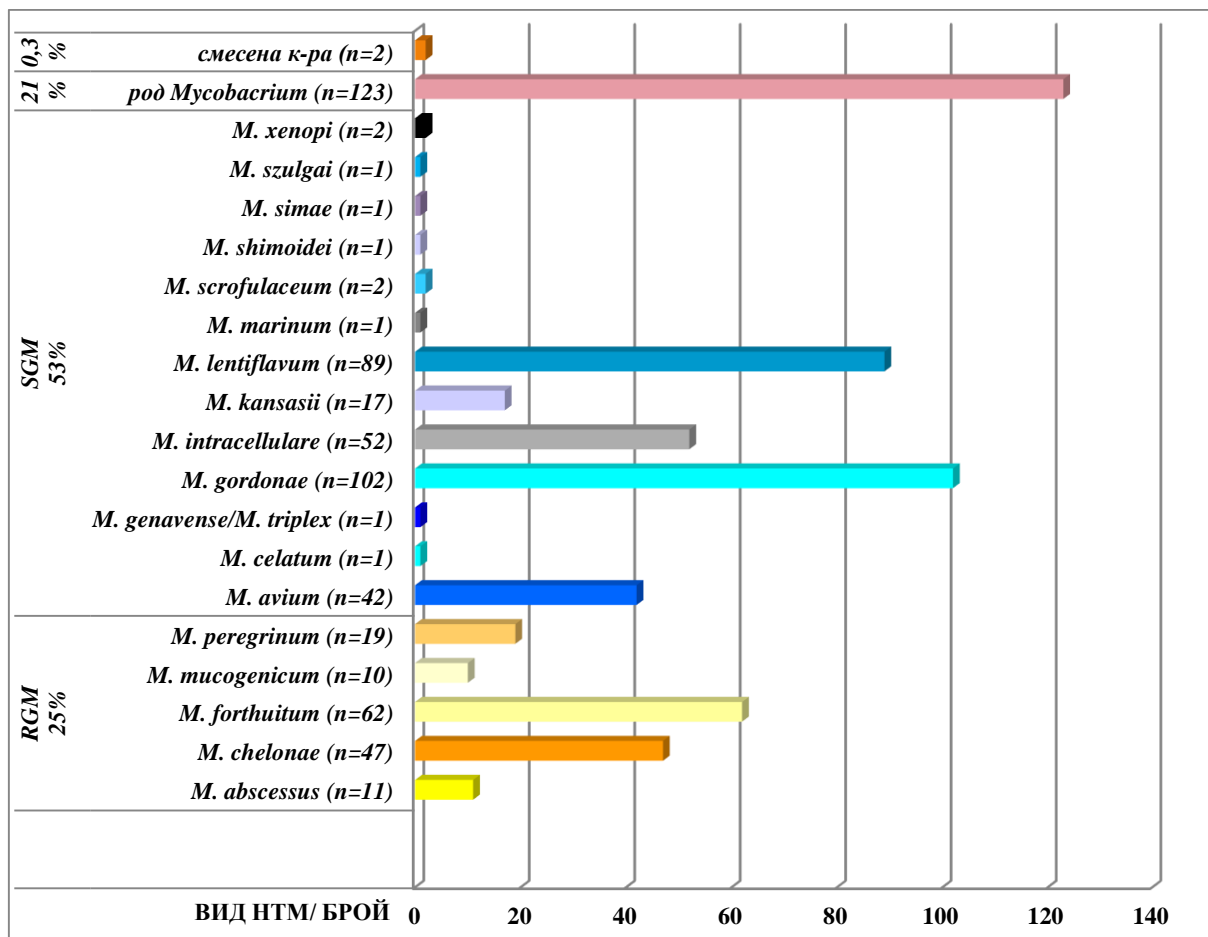
Фигура 10.: Клиничният материал от който е изолиран щам НТМ, характеризирани по тип и количество.

4. Видова структура на изолираните НТМ

Използваните молекулярно генетични тестове GT *Mycobacterium* CM/AS в съчетание с класически методи ни позволиха да открием най-често изолираните видове НТМ сред изследваните от нас пациенти в България.

Всичките 586 щамове НТМ имат издаден резултат от генетичен тест за видова идентификация. С цел по-нататъшна идентификация, на тези от изолатите при които тестът GT *Mycobacterium* CM не дава точен резултат, но присъства налична специфична сонда за членове от рода *Mycobacterium*, е направен и вторият молекулярно генетичен тест за допълнителна идентификация на клинично значими НТМ. За 226 щамове (38%) от всички изолати, се приложи теста GM *Mycobacterium* AS. В резултат на това, около половината от така тестваните щамове (46%) успяха да бъдат определени до вид. Точна идентификация не получиха 123 (54%) от тях, което представлява 21% от всички изолати. Така те бяха определени чрез използваните от нас генетични тестове единствено като принадлежащи към род *Mycobacterium*, а според фенотипните си отнасяния се числят към групата на бавнорастящите НТМ видове. Големият процент на изолатите които се идентифицират само като род *Mycobacterium* приемаме като ограничение на използваните тестове за идентификация. По тази причина е необходимо в бъдеще, прилагане на по-дискриминативни методи за идентификация, като по-финото видово разграничение би послужило както на клинициста, така и на пациента. В това проучване при 0,3% от материалите са идентифицирани 2 вида едновременно. Една смесена култура от *M. tuberculosis* complex с рифампицинова резистентност и *M. avium* при ХИВ положителен пациент и една смесена култура от НТМ видове – *M. avium* и *M. intracellulare*. Изолирането на повече от един вид микобактерии от една и съща проба или за определен период от време е доказана характеристика на белодробната инфекция с НТМ, а основната причина е неясна, но се предполага, че при тези случаи може да играе роля хроничното възпаление и ремоделирането на дихателните пътища при пациенти с белодробни изменения (Lim HJ et al., 2011; Lee JS et al., 2017).

Резултатите от установеното от нас НТМ видово разнообразие на тестваните за периода пациенти са показани на **Фигура 11**. За периода най-често се изолират следните НТМ видове или комплекси: *M. gordonae* (17%), *M. lentiflavum* (15%), *M. fortuitum* (11%), *M. intracellulare* (9%), *M. chelonae* (8%), *M. avium* (7%). Преобладават бавнорастящите 53%(n=312), а 25% (n=149) са бързорастящите НТМ.



Фигура 11.: Пълното видово разнообразие на изолираните щамове НТМ в България, за изследвания осемгодишен период.

На първо и второ място по честота на изолация са видове, които по-рядко се докладват като сериозни причинители на инфекции. Докато *M. gordonae* се изолира в материали на пациенти от цялата страна, то причината за челните позиции на *M. lentiflavum* е пикът през 2015 - 2016 г. в детско отделение на едно конкретно лечебно заведение в страната, който може да бъде обяснен с вероятна контаминация на стомашни промивни води в етапа на процедурата по вземане на съответния клиничен материал.

При сравняване на получените от нас резултати с проучвания в държавите от ЕС, се забелява еднопосочност на тенденцията към увеличаване на общите нива на изолация на НТМ. Последователността на най-често съобщаваните видове леко се променя за различните държави от ЕС, но включва: *M. avium*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* и *M. xenopi*, като средно 7% от всички изолати не могат да бъдат идентифицирани до вид (van der Werf et al., 2014). В Нидерландия увеличението е

причинено главно от повишена изолация на *M. avium* и *M. gordonae* в белодробни проби и е най-силно изразено при пациенти на възраст над 40 г. (van Ingen J et al., 2010). За Италия най-често изолираните видове са *M. avium* (29,2%), *M. intracellulare* (21,5%), *M. xenopi* (10,6%), *M. gordonae* (10,6%), *M. abscessus* (5,9 %), *M. chimaera* (5.1%), като най-често пациентите са мъже над 75 г. (L. Fattorini, et al., 2020).

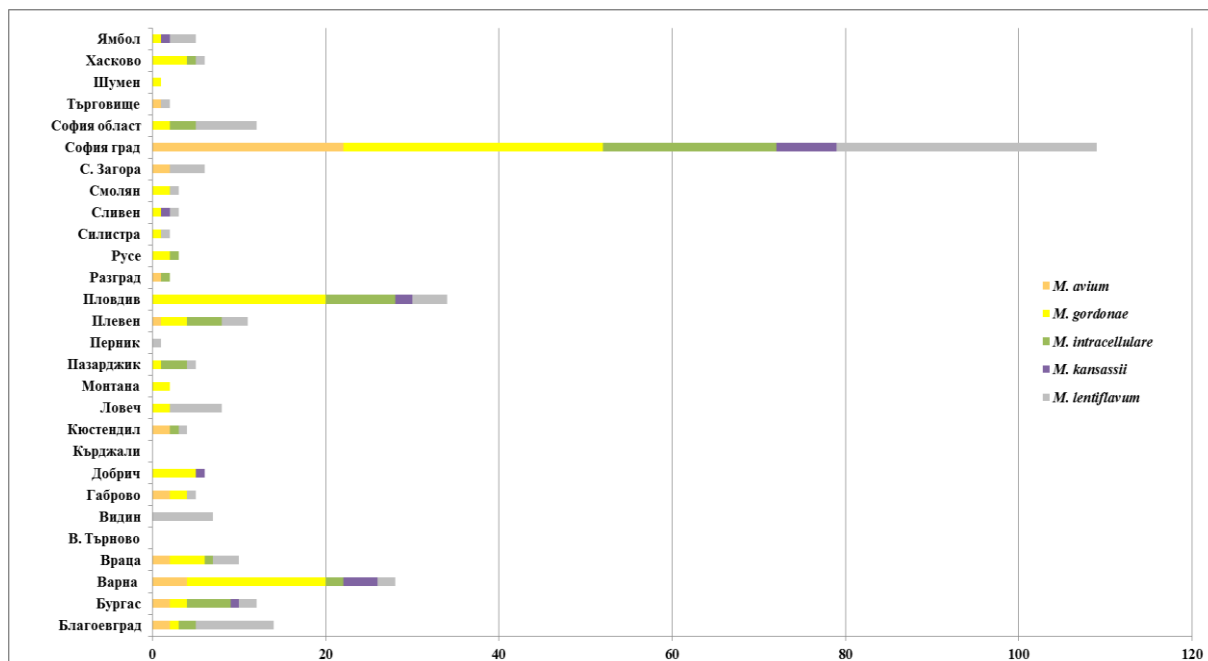
Клинично значимите SGM от групата на MAC са с по-ниски нива на изолация в България, съответно на четвърта и шеста позиция за *M. intracellulare* и *M. avium*. Докато в ЕС *M. avium* не само доминира в групата на MAC, но е и на първо място сред всички изолати, докато при нас превес има *M. intracellulare*. Това може да бъде обяснено с ниските нива в нашата страна на HIV–позитивните пациенти, при които видовете от тази група предизвикват коинфекция. Също така излагането на въздействието на водоснабдяването - битово и естествено е рисков фактор за развитие на *M. intracellulare* белодробни инфекции (Wallace RJ Jr. et al., 2013), но не сме изследвали тази потенциална връзка в нашата страна, което може да бъде едно бъдещо проучване, предвид големият му обем. Докато *M. intracellulare* се среща по-често при мъже над 45г. от Южна България, то *M. avium* се изолира с еднаква честота и при жени и при мъже над 25 г., като отново преобладава сред жителите на Южна България.

Един от често срещаните видове за държавите от Европа - *M. xenopi* е представен само с два изолата в нашата страна, което го прави рядък за изолация. Причината може да се дължи на затруднения растеж *in vitro* за *M. xenopi* в резултат на неговата бавна скорост на репликация, съчетана с неоптимизирано време на инкубация. Проучвания показват, ненадеждното му откриване чрез автоматизираните системи (C. Piersimoni et al., 2009) и, че над 50% от неговата изолация се увеличава, ако се удължи времето на инкубация на пробите (Valeria Cento, et al., 2020).

С единични изолати в страната са установени следните SGM – *M. celatum*, *M. genavense*, *M. marinum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. szulgai* – по 0,2%, а *M. xenopi* и *M. scrofulaceum* са с по два изолата – по 0,3%, поради което можем да приемем, че тези видове са рядко срещани и са географски ограничени за нашата страна. Като редки НТМ видове, ATS дава възможността да се определят тези от видовете НТМ, които не попадат в групата на най-често идентифицираните за дадена територия (Kim, J et al., 2015). Според адресната регистрация на пациентите от които те са изолирани, само един живее в Южна България, област Ст. Загора (10%), като той е с изолиран *M. genavense*, а от чужденец - пакистански гражданин е изолиран *M. scrofulaceum*, като видът е вторият най-

често изолиран НТМ с нива от 6,8% за района на Южна Азия (Hoefsloot W. et al., 2013). Останалите 90% (n=9) от тези редки за страната видове преобладават при жителите на Северна България. Прави впечатление, че 40% (n=4) от тези щамове са на пациенти живеещи в силно урбанизирания крайбрежен регион Добрич-Варна. За района на Варна са установени по един изолат на *M. celatum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, като двама от пациентите са със зависимости. От гр. Добрич при мъж над 60г. е идентифициран един *M. szulgai*. Някои от факторите, които според водещи автори влияят и могат да се считат за причина за това разпространение в района включват: морския по-влажнен и топъл климат, карстов терен, вида почви характерни в района, както и повишена честота на туберкулозата (Falkinham JO 3rd., 2009). Доказано е, че минерали широко срещани в глинести почви като каолин улесняват растежа на НТМ (Malcolm et al., 2017). По отношение на честотата на туберкулозата за района на Варна и Добрич тя е на нива средни за страната (27,9/100 000) (Габриела Цанкова, 2013).

На **Фигура 12** е онагледено разпределението по области на дяловото представяне на по-често изолираните SGM (*M. gordonae*, *M. lentiflavum*, *M. intracellulare*, *M. avium* и *M. kansasii*). Те са застъпени в цялата страна с различна честота, като само в област В. Търново не е изолиран нито един от тези чести за страната видове. Докато видовото разнообразие не се различава силно по региони, то само в София-град и област Варна са застъпени всичките пет вида. Доминирацията и най-често изолтран SGM е *M. gordonae*, като той се открива в 74% от оластите. В столицата, област Пловдив и в област Варна е значително по-висока честотата на изолацията. Това се дължи най-вече на повишените нива на *M. gordonae* и *M. lentiflavum*.



област/брой НТМ

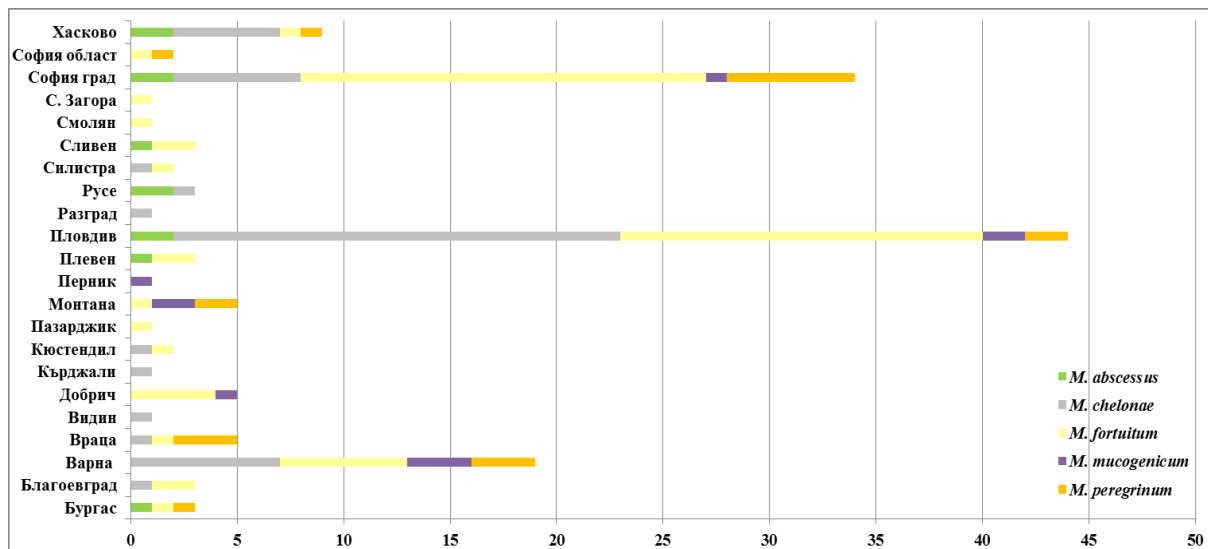
Фигура 12: Разпределение на най-често изолираните SGM по области в страната.

Бързорастящите НТМ в страната са 25% (n=149) от всички наши НТМ изолати, като това са нива на изолация са по-високи от средните за Европа и и по-близки до тези на азиатските държави. В страната най-голям е делът на *M. fortuitum* (42%), който е доминиращия RGM и в Северна, и в Южна България, следван от *M. chelonae* (32%) и *M. peregrinum* (13%). Редът на често изолираните RGM се дублира за двете географски области, като единствено делът на представителите на *M. mucogenicum* е близо три пъти по-висок в изолатите от Северна България. И двата вида (*M. fortuitum* и *M. chelonae*) се изолират по-често от мъже над 15 г. от Южна България. Докато *M. abscessus* държи първенство при тази група НТМ в държавите от ЕС, то неговото разпространение в България е слабо застъпено - едва с 2% от НТМ . Той е един от видовете, най-често асоцииран и изолиран при пациенти с муковисцидоза, а такава работна диагноза не е посочена при нито един от пациентите с този изолат, включени в нашето проучване.

В световен мащаб RGM представляват между 10 и 20% от всички НТМ изолати, като тези колебания се отнасят и за Европейския регион. Най-често се идентифицират *M. abscessus* и *M. fortuitum* (Hoefsloot W. et al., 2013). Наблюдават се важни географски разлики. Бързорастящите видовете са силно разпространени в Източна Азия, където съставляват 27% от НТМ изолатите в сравнение със Северна Америка (17,9%), Южна Америка (16%) и Европа (14%). На самият азиатски континент има различия в честотата

на изолиране сред държавите и областите в тях. Например в Токио (Япония) те са само 6,6% от всички изолати, за разлика от Южна Корея (28,7%) и Тайван (50%). В Тайван *M. fortuitum* и *M. abscessus* са вторият и третият най-често изолиран вид НТМ след МАС, докато в Южна Корея *M. abscessus* е вторият най-често изолиран НТМ след МАС (Chen CY. et al. 2012).

Причината за високата степен на белодробната изолация на RGM в азиатските страни остава неясна, въпреки че са обсъждани географски, климатични или расови фактори. Правени са и проучвания, фокусирани върху специфичните за видовете екологични ниши и последващо им предаване на хора (Simons SO. et al. 2011).



област/брой НТМ

Фигура 13. : Видов спектър на RGM в България доказан в периода 2010-2017г.

На територията на страната се оформят три основни области на изолация на бързорастящи НТМ видове и това са: област Пловдив, София-град и област Варна. В тях се доказват 65% (n=97) от видовете, като само в област Пловдив и София град се изолират и всичките пет RGM вида изолирани от територията на страната, но с тази разлика, че Пловдив е областта където доминиращият изолат е *M. chelonae* (48%), следван от *M. fortuitum* (39%), а в столицата *M. fortuitum* е доминанта (**Фигура 13**). Климатични фактори като: ср. год. температура и валежи могат да обяснят това райониране за страната на видовете RGM. Изследвания, проследяват връзката между климатичните условия, средната годишна температура, валежите и видовото

разнообразие на изолираните RGM. Стремежът е да се определи ефектът им върху активността на RGM видовете, защото се предполага че при увеличение на валежите се потиска аерозолната им дисперсия в образувалите се прахови частици. Установява се, обратното, че тя се увеличава при едновременно протичане на силни бури в условия на висока влажност, като например циклони или постоянни ветрове. (Falkinham, J. O. 3rd., 2002). Това се потвърждава за Куинсланд, Австралия, където се приема, че температурата и валежите са причина за честотата на инфекции с НТМ, в частност с RGM (Rachel, M. T. et al., 2020). За Хюстън, САЩ, където около 90% от RGM инфекциите са причинени от *M. abscessus*, *M. fortuitum* complex и *M. mucogenicum* се съобщава, че се наблюдава тяхното увеличаване през лятото и есента, когато температурите са над 15°C и валежите се увеличават (Han, X. Y., 2008). Отчита се, че *M. fortuitum* и *M. chelonae* са по-малко активни в райони, където средната годишна температура е под 15°C, което рефлектира в това, че в тези район *M. abscessus* представляват по-висок дял от общия брой RGM. Тази хипотеза би обяснила видовото разпределение на RGM в България, но има нужда от допълнителни бъдещи проучвания с подобро описание при вземането на клинични материали.

В проучването за осемгодишния период определихме нива на изолация на НТМ от 1/100 000, като сме се ръководили от лабораторно базиран подход, при които се приема съответствието между пациент с изолат и заболяване (Cassidy PM. Et al., 2009).

Съгласно микробиологичните критерии за НТМ ББ, посочени от ATS (консенсусни решения, използвани в Европа и в целия свят) в групата на нашите пациентите с покрити критерии за диагноза микобактериоза, би следвало да включим: пациенти с доказан НТМ в повече от един клиничен материал за периода; HIV-позитивните; наркозависимите; пациенти едновременно с положителен резултат от микроскопско изследване за КУБ на БАЛ и уникални материали (ликвор), съответно общо за периода на проучването това са 23% (n=132) от пациентите. Така като използваме данните на НСИ, за да определим средната стойност на населението в страната за периода от 2010 до 2017 година включително, получаваме ниво на заболяемост за микобактериоза от 0,23/100 000 души.

Включените в в тази група пациенти с изолат от НТМ, които покриват критериите за микобактериоза са както следва:

- При 37 (6%) пациента за осемгодишния период на проучването е изолиран повече от един щам НТМ, както следва: на 26 пациента по 2 щам, на 5 по 3 щам, на 2 -

4 щамы, на 1 - 5 щамы, 2 по 6 щамы и на 1 - 9 щамы. За тези 37 пациента, при 81% (n=30), всички резултати съвпадат и независимо от броя изследвания и те са с един вид НТМ изолат. При останалите 7 пациента са отчетени различни НТМ, но независимо от това в нашето изследване ние сме предпочели само един от видовете. Причини за това решение са: повторямост на изолата в случаите когато има повече от 2 изследвания, съчетаване с положителен резултат от микроскопско изследване, елиминирание на контаминант от околната среда. Преобладават мъжете - 59% (n=22) и 41% (n=15) жени. Категорично в тази групата на пациенти с многократни изолати, доминиращи са представителите на МАС (n=21), като *M. intracellulare* (n=16) е 2 пъти повече от изолатите на *M. avium* (n=5). При бързорастящите представителите на *M. abscessus* са равностойни на *M. fortuitum*. Определени са следните видове: *M. abscessus* (n=4), *M. avium* (n=7), *M. chelonae* (n=1), *M. fortuitum* (n=4), *M. intracellulare* (n=16), *M. kansasii* (n=1), *M. lentiflavum* (n=1), *M. peregrinum* (n=2), род *Mycobacterium* (n=1).

- групата на HIV-позитивните е 1% (n=7) от всички идентифицирани НТМ, като преобладават мъжете 57% (n=4), разпределени във възрастовите групи от 25 до 54 години. HIV-позитивните жени са 29 % (n=2) само във групата на 55-64 годишните. За 14% (n=1) няма споделена информация за пол и възраст. Сред тях се изолират: *M. avium* 43% (n=3), по 14% (n=1) за *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. lentiflavum* и смесена култура от *M. avium* и МТВС.

- Наркозависимите пациенти са 2% (n=9). При тях по n=2 за *M. gordonae* и род *Mycobacterium* и по един: *M. lentiflavum*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. shimoidei*, като трябва да се подчертае, редките за страната изолати на *M. shimoidei* и *M. scrofulaceum* са на пациенти от тази група Жените 44% (n=4), а мъжете са с един повече (n=5). С адресна регистрация от област Варна са 89% (n=8) от попадащите в групата пациенти, а едни е от област Плевен.

- Пациентите с изолат на НТМ от БАЛ (n=67) и уникални материали (ликвор - n=2) от всички, от които с положително микроскопско изследване за КУБ са 9% БАЛ (n=6) са, както и един ликвор. От тези материали са идентифицирани: *M. intracellulare* (n=1), *M. avium* (n=2), *M. gordonae* (n=2), *M. abscessus* (n=1) от БАЛ, а от ликвор - *M. fortuitum* (n=1). Всички пациенти са във възрастовите групи над 54 гдини.

- При един пациент има хистолохично потвърждаване на микобактериоза – изолиран е *M. marinum*.

- Пациенти непопадащи в споменатите категории, но които са с работни дигнози за белодробни изменения са 2% (n=9), като съответно при тях се изолира: *M. kansasii* (n=2), *M. chelonae* (n=2), *M. fortuitum* (n=5).

Така за първи път изчислихме какво е бремето на честотата на изолация на НТМ в България. Като приложим възможните и вероятни критерии за заболяване в резултат на изолация на НТМ годишната честота възлиза на 1/ 100 000, а при прилагане само на микробиологичните критерии (ограничаване само до вероятна болест) - 0,23/ 100 000.

И в двата случая отчитаме, че тежестта на микобактериозата остава ниска в сравнение с туберкулозата, като тенденцията е честотата на изолиране да се повишава.

V. ИЗВОДИ

В настоящия дисертационен труд са представени и анализирани резултатите от микробиологичните изследвания на клиничните изолати НТМ, изолирани на територията на България в периода 2010-2017 г. Въз основа на получените резултати направихме следните изводи:

1. Успешно се отдиференцираха изолатите на НТМ от *M. tuberculosis* complex, чрез прилагане на комплекс от методи - фенотипни и имунохроматографски.
2. Щамовете се идентифицираха до НТМ вид чрез използване на молекулярно генетичния метод на принципа на обратна хибридизация.
3. Показа се ясна тенденция за увеличаване на щамовете НТМ в рамките на посочения период, локализира се типа клиничен материал и се направи демографска характеристика на засегнатата група пациенти.
4. Установихме се, че в страната преобладават бавнорастящи НТМ видове.
5. В периода 2010-2017г. честота на идентифицираните от нас бързорастящи НТМ в България е 25% - стойност по-висока от средната за Европа и по-близка до тази на азиатските държави.
6. Шестте най-често изолирани НТМ вида са: *M. gordonae*, *M. lentiflavum*, *M. forthuitum*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. avium*.
7. Определихме, че в България изолацията на НТМ е силно свързана с възрастта и по-често засяга мъжете.
8. Установихме, че разпространението на видовете НТМ, значително се различава между Северна и Южна България, както и между столицата и останалите региони на страната

VI. ПРИНОСИ

1. Приноси с научен характер

- 1.1. Доказахме, че НТМ са разпространени в клинични материали на пациенти в страната и те са съпоставими с най-често изолираните НТМ видове в Европа.
- 1.2. За първи път беше направена характеристика на видовете на НТМ изолирани от клинични материали и се анализира географското им разпространение в страната, като и картирахме най-често изолираните НТМ по области.
- 1.3. За точна видова идентификация на НТМ, приложихме молекулярни методи за линейна хибридизация.
- 1.4. С получените от нас резултати формирахме базата данни с цел проследяване на тенденцията на разпространението на НТМ щамове в страната и определяне на тяхното клинично значение.

2. Приноси с научно-приложен характер

2.1 Изработихме и въведохме работещ алгоритъм при изолиране и определяне на НТМ видовете в България.

2.2 Установихме видовото разнообразие на асоциираните с човешката патология НТМ щамове в страната.

2.3 Идентификацията на конкретните видове НТМ, служи за прилагане на подходяща етиотропна терапия.

2.4 Направено е и изчисление на евентуалната заболяемост от микобактериоза, при положение, че се приеме съответствието между пациент с изолат и заболяване. Определяме я като 1/ 100 000 души средно за периода 2010 – 2017 година.

2.5 При прилагане на микробиологичните критерии на ATS за разграничаване на възможно от вероятно заболяване, белодробна микобактериоза в страната за осемгодишния период се определя като 0,23/ 100 000 души.

2.6 Изготвихме първата биобанка с колекция от български клинично значими НТМ щамове.

VII. ЛИТЕРАТУРА

1. МЗ. (2016). Методично указание за микробиологична диагностика на туберкулозата 2016
2. Cassidy P M, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop K L. (2009). Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *CID* 2009; 49: 124–129.
3. Cento V., Nava A., Lepera V., Torri S., Colagrossi L., Fanti D., Vismara C., Perno C. F., Mazzola E. (2020). Prolongation of incubation time improves clinical diagnosis of *Mycobacterium xenopi* infection and allows susceptibility testing of mycobacterial strains against multiple antibiotics. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Sep; 22:533-537.
4. Charles S. Haworth, John Banks, Toby Capstick, et al. (2017). British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD); *Thorax*; 2017, Nov; 72 (Suppl 2):ii1-ii64. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210927. PMID: 29054853.
5. Chen C. Y., Chen H. Y., Chou C. H. , et al. (2012). Pulmonary infection caused by nontuberculous mycobacteria in a medical center in Taiwan, 2005–2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72: 47–51.
6. Daley Charles L, Jonathan M Iaccarino, Christoph Lange, Emmanuelle Cambau, Richard J Wallace, Jr, Claire Andrejak, Erik C Böttger, Jan Brozek, David E Griffith, Lorenzo Guglielmetti, Gwen A Huitt, Shandra L Knight, Philip Leitman, Theodore K Marras, Kenneth N Olivier, Miguel Santin, Jason E Stout, Enrico Tortoli, Jakko van Ingen, Dirk Wagner, Kevin L Winthrop. (2020). Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 71, Issue 4, 15 August 2020, Pages e1–e36, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa241>.
7. Dicker R, Coronado F, Koo D, Parrish RG. (2012). *Principles of Epidemiology in Public Health Practice*, 3rd Edition: CDC
8. Falkinham, J. O. 3rd. (2002). Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 23:529-51.
9. Falkinham J. O. 3rd. (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 2009; 107(2):356-367.

10. Fattorini L., A. Iacobino, F. Giannoni. (2020). SMI-NTM, Pilot Study on nontuberculous mycobacteria infections in Italy, *European Journal of Public Health*, September 2020, Volume 30, Issue Supplement 5.
11. Griffith D. E., Aksamit T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S. M., Horsburgh R., Huitt G., Iademarco M. F., Iseman M., Olivier K., Ruoss S., von Reyn C. F., Wallace R. J. Jr, Winthrop K.; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 15; 175 (4): 367–416.
12. Han, X. Y. (2008). Seasonality of clinical isolation of rapidly growing mycobacteria. *Epidemiol Infect*. 136, 1188–1191
13. Hoefsloot W., Boeree M. J., van Ingen J., et al. (2008). The rising incidence and clinical relevance of *Mycobacterium malmoense*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 987–993.
14. Hoefsloot W., J. van Ingen Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P et al. Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. (2013). A NTM-NET collaborative study. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study *ERJ Express*. 2013 Dec;42(6):1604-13. doi: 10.1183/09031936.00149212.
15. Hsieh M. H., Chou P. C., Chou C. L. et al. (2013). Matrix metalloproteinase-1 polymorphism (-1607G) and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis in Taiwan. *PLoS One*. 2013;8(6)
16. Kim, J., Seong, M. W., Kim, E. C., Han, S. K., & Yim, J. J. (2015). Frequency and clinical implications of the isolation of rare nontuberculous mycobacteria. *BMC infectious diseases*, 15, 9. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0741-7>
17. Lee J. S., Lee J. H., Yoon S. H., Kim T. S., Seong M. W., Han S. K., et al. (2017). Implication of species change of nontuberculous mycobacteria during or after treatment. *BMC Pulm Med*. 2017;17(1):213.
18. Lim H. J., Park C. M., Park Y. S., Lee J., Lee S. M., Yang S. C., et al. (2011). Isolation of multiple nontuberculous mycobacteria species in the same patients. *Int J Infect Dis*. 2011;15(11):e795.

19. Malcolm K. C., Caceres S. M., Honda J. R., Davidson R. M., Epperson L. E., Strong M., et al. (2017). *Mycobacterium abscessus* displays fitness for fomite transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e00562-17
20. Piersimoni C., D. Nista, S. Bornigia, G. Gherardi. (2009). Unreliable detection of *Mycobacterium xenopi* by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture system. *J Clin Microbiol*, 47 (2009), pp. 804-806.
21. Pinner M. (1935). Atypical acid-fast Microorganisms. *Am Rev Tuberc* 1935; 32: 424-439.
22. Prevots D. R., Shaw P. A., Strickland D., Jackson L.A., Raebel M.A., Blosky M.A. et al. (2010). Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182: 970–976.
23. Rachel, M. T. et al. Influence of climate variables on the rising incidence of nontuberculous mycobacterial (NTM) infections in Queensland, Australia 2001–2016. *Sci. Total Environ.* 740, 139796 (2020).
24. Sánchez-Chardi A., Olivares F., Byrd T. F., Julián E., Brambilla C., & Luquin M. (2011). Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 2011, 49(6), 2293–2295
25. Simons S., van Ingen J., Hsueh P. R., Van Hung N., Dekhuijzen P.N., Boeree M.J. et al. (2011). Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 343–349
26. Szturmowicz M., Siemion-Szcześniak I., et al. (2018). Factors predisposing to non-tuberculous mycobacterial lung disease in the patients with respiratory isolates of non-tuberculous mycobacteria. *Adv Respir Med* 2018, Dec 30. PMID: 30594992 doi:10.5603/ARM.a2018.0043.
27. van der Werf M. J., Ködmön C., Katalinić-Janković V., Kummik T., Soini H., Richter E., Papaventsis D., Tortoli E, Perrin M., van Soolingen D., Zolnir-Dovč M., Ostergaard Thomsen V. (2014). Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. 2014, *BMC Infect Dis.* 2014 Feb 6;14:62. doi: 10.1186/1471-2334-14-62.

28. van Ingen J., Boeree M. J., de Lange W. C., de Haas P. E., Dekhuijzen P. N, van Soolingen. D., J. Walton Tomford, Ioachimescu Octavian C. (2010). Nontuberculous Mycobacterial Disorders.; Cleveland Clinic Nontuberculous Mycobacterial Disorders; Current Clinical Medicine Elsevier book-chapter; 765-774
29. Wallace R. J. Jr, Iakhiaeva E., Williams M. D., Brown-Elliott B. A., Vasireddy S., Vasireddy R., Lande L., Peterson D. D., Sawicki J., Kwait R., et al. (2013). Absence of *Mycobacterium intracellulare* and presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2013;51:1747–1752.

VIII. ПРИЛОЖЕНИЕ

Списък публикации, свързани с дисертацията

Е. Бачийска, **Ю. Атанасова**, К. Иванова. (2007). МОТТ – Ново предизвикателство пред микробиологичната диагностика на микобактериозите в страната, Инфектология, Supplement, том XLIV, 2007, 58-61

Елизабета Бачийска, **Юлияна Атанасова**, Станислава Йорданова, Ана Байкова, Тодор Кантарджиев, Микробиологична диагностика на респираторните микобактериози в България, In Spiro, бр. 4, декември 2012, ISSN 1313-4329, стр.6.

Y. Atanasova, E. Bachiyska, S. Yordanova, Y. Todorova, A. Baykova, T. Kantardjiev, Rapidly growing Mycobacteria in suspected for tuberculosis patients in Bulgaria, Problems of infectious and parasitic diseases, volume 42, Number 2/2014, Sofia, 14-16.

Yuliana Atanasova, Stanislava Yordanova, Yana Todorova, Ana Baikova, Senior Assistant Elizabeta Bachiyska, Distribution of *Mycobacterium avium* complex in Bulgaria. Probl. Inf. Parasit. Dis. Vol. 46, 2018, 2

E. Bachiyska, **Y. Atanasova**, A. Baikova, S. Yordanova, Y. Todorova. First etiologically confirmed cases of *Mycobacterium marinum* infection in Bulgaria, 2020, Folia Medica 62(2): 398-402 DOI: 10.3897/folmed.62.e47220

Участия в конгреси и научни форуми, свързани с дисертацията

E. Bachiyska, **Y. Atanasova**, A. Baikova, S. Yordanova, Y. Todorova, T. Kantardjiev. (2014). Five-year Study of Nontuberculous Mycobacteria Isolates in Bulgaria., 35th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology., 29.06-02.07.2014, Vienna., P 132.

E. Bachiyska, **Y. Atanasova**, S. Yordanova, Y. Todorova, T. Kantardjiev. (2015). Spread of nontuberculosis mycobacteria in Bulgaria among the patients suspected for tuberculosis – microbiological diagnosis, 6-8 November 2015, Struga, Macedonia

Ю. Атанасова, С. Йорданова, Е. Бачийска, Я. Тодорова, Т. Кантарджиев. (2015). Разпространение на *M. avium* и *M. intracellulare* в България, 2012-2014, 13 конгрес, БАМ, София, 16-18.04.2015 Сборник научни трудове, стр. 62.

Ю. Атанасова, Е. Бачийска, С. Йорданова, Я. Тодорова, А. Байкова, Т. Кантарджиев. (2016). Нетуберкулозни микобактерии в България – разпространение и диагноза, 14 конгрес на БАМ, София, 12.05.-14.05. 2016, Постерна сесия 2, П 30, Сборник научни трудове, стр. 63.

Ю. Атанасова, Е. Бачийска, С. Йорданова, Я. Тодорова, А. Байкова, Т. Кантарджиев. (2017). Вътреболнични инфекции причинени от нетуберкулозни микобактерии в България. 15ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, София, 17.05-19.05.2017. Сборник научни трудове, П 38, стр. 65

Юлияна Атанасова, Е. Бачийска, А. Байкова, С. Йорданова, М. Минкова, М. Цолова, Г. Михайлова. (2018). Микробиологична диагноза на коинфекцията HIV/HTM в България; 3-ТА НАЦИОНАЛНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ ПО HIV И КОИНФЕКЦИИ 30 Ноември - 1 Декември 2018 г. Централ Парк Хотел, София

Ю. Атанасова, С. Йорданова, А. Байкова, Я. Тодорова, Е. Бачийска. (2018). Разпространение на Нетуберкулозни микобактерии в София-град за период от 1 година. 16ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, София, 10.-12 май 2018 ОП, Сборник научни трудове, П 15, стр. 52.

Ю. Атанасова, А. Байкова С. Йорданова, Е. Бачийска. (2019). Молекулярен метод за определяне на антимикробната резистентност на някои видове нетуберкулозни микобактерии.; 17и Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, София, 09.-11 май 2019 ОП,

Ю. Атанасова, А. Байкова С. Йорданова, Е. Бачийска. (2020). Географско разпространение в България на някои видове нетуберкулозни микобактерии, 18и Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, София, 30.09.-02.10.2020. Сборник научни трудове, П 40, стр. 106-107.

IX. Благодарности

Изказвам своята искрена признателност, уважение и благодарност на научните ми ръководители: проф. д-р Тодор Кантарджиев и доц. д-р Елизабета Бачийска, които ме подкрепиха и ми предоставиха свободата за работа.

За оказаната помощ и подкрепа, сътрудничество, конструктивни съвети, и стимулиращи дискусии благодаря на колегите си от НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ: Ана Байкова, гл. асистент Станислава Йорданова, гл. асистент Яна Тодорова, Габриела Василева.

Благодаря за съдействието и предоставената информация на ръководстводителите и лабораторния състав на микобактериологичните лаборатории в страната.

Благодаря за финансирането и предоставените ни необходимите консумативи и реактиви на Програмата от Глобалният фонд за борба със СПИН, туберкулоза и малария - BUL-607-G02-T, BUL-809-G03-T.

ABSTRACT

The increase in the isolation of non-tuberculous mycobacteria has been reported worldwide, but except for isolated reports, there was no accurate information of situation on the territory of Bulgaria. By reason of demographic changes, such as the aging population, increasing the number of immunosuppressed; emerging serious migration flows through last years, and the impact of climate change and natural disasters, the problem with NTM diseases will continue to aggravate in our country.

The purpose of this study is to present data on the prevalence of NTM in our country, as well as to be the basis for a future plan for surveillance of NTM infections in Bulgaria.

We clarified the distribution and species diversity of NTM in retrospect for eight years from 2010 to 2017 inclusive from 586 clinical materials, in patients suspected of tuberculosis or those with pulmonary pathology. Overall 97% (n=567) NTM strains were isolated from pulmonary sites. It is strongly related to age and sex - the average patients are 47 years old and more often affects men (58,5%, n=343). We performed accurate species identification of isolated mycobacteria using conventional and molecular methods (Genotype) and revealed valuable epidemiological information. The incidence of mycobacteriosis is lower than that of tuberculosis.

The reported results show an increase in the isolation of NTM from clinical samples for the indicated period. The most frequent species in the country were: *M. gordonae* (17%), *M. lentiflavum* (15%), *M. fortuitum* (11%), *M. intracellulare* (9%), *M. chelonae* (8%), *M. avium* (7%). Slowly Growing Mycobacteria dominate. While *M. gordonae* is isolated in the materials of patients from all over the country, the reason for the leading positions of *M. lentiflavum* is the peak in 2015-2016 in the children's ward of a particular hospital in the country, which can be explained by possible contamination of gastric lavage at the stage of the procedure for taking the clinical samples. The isolates from MAC group have no leading positions, respectively in the fourth and sixth positions for *M. intracellulare* and *M. avium*. In Bulgaria *M. intracellulare* is predominant. It is more common in male over 45 years old from Southern Bulgaria. *M. avium* is isolated with equal frequency in female and male over 25 years old, and predominating among the inhabitants of Southern Bulgaria. One of the most common species for European countries - *M. xenopi* is represented by only two isolates, which makes it a rare isolation for our territory.

Rapidly Growing Mycobacteria in Bulgaria have average levels of isolation higher than the European countries. Bulgaria is closer to Asian countries with isolation rate of RGM from

25%. *M. fortuitum* is the dominant RGM (42%), followed by *M. chelonae* (32%) and *M. peregrinum* (13%), *M. abscessus* (7%), *M. mucogenicum* - (6%).

As a genus *Mycobacterium* without the possibility of more accurate identification are identified 21% of NTM in the country. The reason for this high percentage should be sought in the identification methods we used.

In summary, the distribution of NTM in the country is unevenly. The species diversity of NTM is greater in Northern Bulgaria, particularly in the area of the northern Black Sea coast but in Southern Bulgaria the frequency of NTM isolation is higher. In three of the most urbanized districts - Sofia, Plovdiv and Varna, live 57% (n = 334) of patients with NTM isolate.

After the application of two approved methods, we determined the levels of NTM isolation in the country for the eight-year period and the frequency of mycobacteriosis. As we are guided by a laboratory-based approach, which assumes the correspondence between a patient with an isolate and a disease, we determine the value of the prevalence of NTM in Bulgaria from 1/100 000 for the period 2010 - 2017. Due to the often insufficient clinical and radiological data accompanying the materials we accept this approach as useful and predictable disease. It also has its limitations, because the assessment of the real severity of mycobacteriosis in the country made in this way is not completely accurate. In some cases, we would overestimate it (for example, in *M. gordonae*, *M. lentiflavum*) or underestimate it if only one sample is sent to the laboratory identification without further material for re-isolation or the patient has been tested in time interval not in accordance with the study.

The second method is according to the microbiological criteria for pulmonary nontuberculous mycobacterial diseases specified by American Thoracic Society (ATS). For the entire study period only in total 23% (n=132) of the patients met the ATS criteria, that we obtain levels of incidence of probable pulmonary NTM disease of 0.23 per 100,000 population.

Thus, for the first time we calculated the burden of the frequency of NTM isolation in Bulgaria. Applying the possible and probable criteria for disease as a result of NTM isolation, the frequency is 1/100,000 for the eight-year period, and when applying only the microbiological criteria (limitation to probable disease only) - 0.23/100,000 for the same period. In both cases, we report that the severity of mycobacteriosis remains low compared to tuberculosis, and the frequency of isolation tends to increase.